



Centro Universitário de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Bioteχνologias em reprodução assistida na preservação de animais silvestres em extinção

LUCIANA MIRANDA MATTOS

Brasília - 2001

Centro Universitário de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Licenciatura em Ciências Biológicas

Biotecnologias em reprodução assistida na preservação de animais silvestres em extinção

Luciana Miranda Mattos

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^o: Cláudio Henrique Cerri e Silva

Brasília - 2001

RESUMO

Este trabalho propõe uma abordagem da importância da conservação e as biotécnicas que podem ser utilizadas para a preservação e reprodução de animais que se encontram em perigo de extinção. Hoje as biotecnologias utilizadas em vários países do mundo, inclusive no Brasil para reprodução assistida de diversas espécies de animais silvestres são: Inseminação Artificial, Transferência de Embriões, Fecundação *in vitro*, Criopreservação, Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide, Clonagem, Isolamento de Folículos Pré-Antrais. A reprodução assistida tornou-se o tratamento de escolha para muitos problemas que afetam a fertilidade animal. A diversidade biológica é a chave para a manutenção da vida como nós a conhecemos e não há dúvidas que a destruição do habitat é o principal fator responsável pela redução da biodiversidade, ou no número total de espécies que coexistem no planeta. O rápido crescimento dos locais de populações humanas pressiona extradiariamente o ecossistema, provocando destruição ambiental em grande escala, fragmentação do habitat e da população.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	5
2. A extinção.....	6
3. Espécies em perigo.....	8
4. Aumenta a preocupação.....	9
5. Preservação X Extinção.....	11
6. Ajuda Internacional.....	11
7. Animais em Perigo X Animais em Extinção.....	12
8. Como resolver o problema.....	13
9. Intervenção humana – A reprodução assistida.....	13
10. Processo natural de fertilização.....	14
10.1. O ovócito.....	14
10.2. O espermatozóide.....	14
10.3. Fertilização.....	15
10.4. Principais causas da infertilidade do macho.....	16
11. A Biotecnologia.....	17
11.1. A ciência precursora.....	17
12. Biotecnologias da Reprodução Animal.....	18
12.1. Inseminação Artificial (IA)	18
12.2. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	20
12.3. Transferência de embriões (T.E.) ou Inovulação.....	23.
12.3.1 Transferência não-cirúrgica.....	25
12.3.2. Transferência cirúrgica.....	25
12.4. Criopreservação ou Vitrificação.....	26
12.5. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI)	28
12.6. Clonagem – Transferência de Núcleo.....	30
12.6.1. Clonagem somática.....	32
12.7. Isolamento de Folículos Pré-Antrais (FOPA)	33
13. Uma arca para a salvação.....	34
14. Projeto Arca de Noé.....	35
14.1. BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal.....	35
15. Conclusão.....	37
16. Referências Bibliográficas.....	38

1. INTRODUÇÃO

Hoje, milhares de espécies de animais silvestres em todo o mundo estão correndo o risco de desaparecerem ou já se encontram extintos, existindo apenas exemplares confinados em cativeiros particulares ou públicos. Poucas dessas espécies que se encontram nestas condições são capazes de se reproduzir ou dar origem a indivíduos aptos para a perpetuação da espécie. Aqueles que passam no teste da reprodução em cativeiro, mal conseguem serem introduzidos em seu ambiente natural (Martho & Martho, 1993).

Na maioria das vezes estes animais, que ajudam a aumentar a lista dos que estão desaparecendo, são de rara beleza, sendo muito cobiçados por colecionadores, circos, traficantes entre outros. Como exemplos temos grandes felinos como a onça-pintada e o tigre de bengala, aves como a arara azul, o urso panda e muitos outros (Martho & Martho, 1993).

As razões que justificam a preservação de pequenas populações ameaçadas de extinção têm sido destacadas em inúmeros documentos e projetos de organismos nacionais e internacionais. Animais desconhecidos pela ciência, estão desaparecendo mesmo antes de terem sido estudadas (Bem *et al.*, 1994).

A biotecnologia e a tecnologia de reprodução assistida, têm sido aplicadas com sucesso para diversas espécies e são claros os benefícios para produção animal, bem como para a biologia de conservação (Solti *et al.*, 2000).

O objetivo deste trabalho é apresentar biotecnologias da reprodução que podem e estão sendo usadas para a multiplicação de animais silvestres em cativeiro e que estão em vias de extinção devido à ocupação humana.

2. A EXTINÇÃO

A caça ou pesca excessivas podem levar as espécies à extinção, pois a capacidade de crescimento de uma população depende do número de indivíduos capazes de se reproduzir. À medida que esse número diminui, decresce a taxa de crescimento da população. Assim sendo, a caça ou a pesca excessivas podem reduzir de tal forma uma população, que sua taxa reprodutiva torna-se menor que a taxa de mortalidade natural. Quando isso ocorre, mesmo que a caça e a pesca sejam suspensas, a população entra em declínio e é levada à extinção. Uma espécie é considerada extinta quando não é avistada na vida selvagem por 50 anos. As espécies ameaçadas de extinção são aquelas que correm risco de ser extintas caso nada mude em suas atuais circunstâncias (Martho & Martho, 1993).

O tamanho mínimo que uma população pode atingir sem se extinguir varia, naturalmente, de espécie para espécie. Depende da sua capacidade reprodutiva, da sua vulnerabilidade às influências do meio e do tempo de duração de seu ciclo vital, entre outras coisas. Das espécies que o homem caça atualmente, muitas estão ameaçadas de extinção por suas populações estarem atingindo o tamanho necessário à recuperação. Outras, mesmo que a caça pare, já não terão capacidade de se recuperar e, fatalmente, extinguir-se-ão (Martho & Martho, 1993).

Esses problemas estão ocorrendo atualmente com a pesca. O mar, para a maioria das pessoas, representa uma fonte inesgotável de alimento. Industriais, economistas e governantes não encaram o mar como um ecossistema, onde as populações estão equilibradas e têm tamanho finito; não respeitam as opiniões dos biólogos, que afirmam que o aumento do esforço de pesca levará à diminuição da quantidade de pescado. Para muitas pessoas, parece absurdo afirmar que o aumento do número de barcos pesqueiros possa levar à diminuição da pesca. No entanto, se lembrarmos que as populações têm seu tamanho regulado por um sem-número de fatores, percebemos como é verdadeira essa afirmação. Muitos países, cuja economia é baseada em grande parte na pesca, já começam a sentir os efeitos da pesca indiscriminada (Martho & Martho, 1993).

Um exemplo que pode mostrar os limites dos recursos do mar é o da pesca de baleias. Em 1933, foram capturadas 28.907 baleias. Em 1966, esse número subiu a 57.891. Das várias espécies apanhadas, a preferida era a baleia azul, que apresentava maior tamanho. Por volta da década de 50, entretanto, o número de baleias azuis

diminuiu muito e passou-se a apanhar também as espécies menores. A pesca continuou, e os estoques de baleias declinaram rapidamente. Em 1960, um grupo de biólogos foi nomeado pela Comissão Internacional da Baleia (ICW) para estudar a situação das populações das baleias antárticas. Em seu relatório, os biólogos previam que se a pesca ilimitada continuasse, no período de 63-64 seriam apanhadas 8.500 unidades de baleia azul. Pretendiam que fossem estabelecidos limites pequenos para a pesca, no entanto, o limite foi de 10.000 unidades, mas apenas 8.429 foram capturadas. Alguns países, como Holanda e Noruega, já abandonaram a pesca de baleias. Mesmo que a pesca fosse completamente paralisada, é provável que muitas das espécies de baleias não consigam evitar a extinção (Martho & Martho, 1993).

A extinção de certas espécies pela caça pode levar, indiretamente, ao prejuízo de outras populações. Um exemplo disso ocorreu com a população de veados do Arizona, E.U.A. (Martho & Martho, 1993).

A população que habitava o planalto de Kaibab, antes de 1907, era estável, oscilando em torno de 4.000 animais. Esse número de veados era inferior à capacidade da pastagem e seu número era mantido pelas populações de predadores que viviam na região, como por exemplo, os pumas e coiotes (Martho & Martho, 1993).

Uma campanha para aumentar a população de veados constitui em eliminar os predadores. O sucesso foi tão grande que, em 1924, a população de veados chegava à cerca de 100.000 animais. Aconteceu o que não tinha sido previsto: tal população, superior à capacidade da pastagem, morreu em massa devido à falta de alimento. Em 1939, a população de veados estava abaixo de 10.000 indivíduos e o pasto ainda era insuficiente, pois, em virtude do pisoteamento e pastagem excessiva, entrou em declínio. Dessa maneira a falta de alimento acabou por matar mais veados de fome do que o faziam seus predadores naturais (Martho & Martho, 1993).

Um dos exemplos de total extinção de espécies é relativo aos chamados Dodos (Fig. 1). Os Dodos eram aves que viviam em ilhas do oceano Índico. O verdadeiro Dodo, *Raphus cucullatus*, habitava a ilha Maurício e extinguiu-se por volta de 1680. Outras duas espécies aparentadas ao Dodo extinguíram-se entre 1750 e 1800, nas ilhas Reunião e Rodriguez (Martho & Martho, 1993).

De acordo com as descrições e figuras da época, além de uns poucos vestígios de esqueletos, o Dodo era uma ave grande, do tamanho aproximado de um peru e com uma cabeça grande, dotada de bico recurvado (Martho & Martho, 1993).

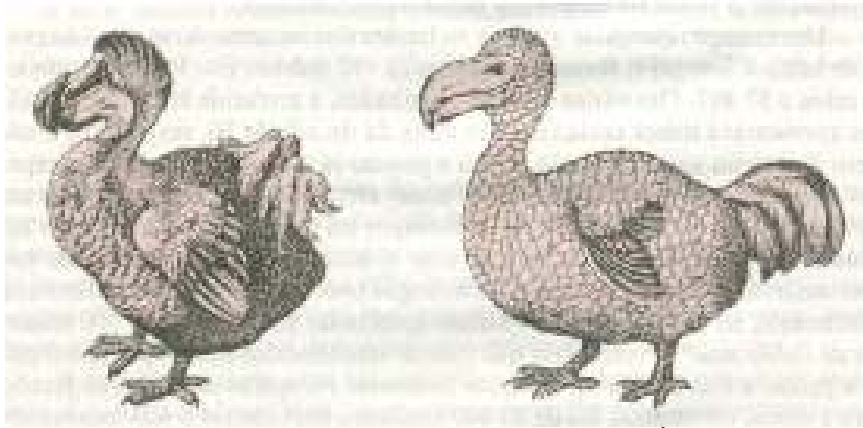


Fig. 1 Desenho de duas espécies de pássaros Dodos. À esquerda, *Raphus cucullatus*, que habitou a ilha Maurício. À direita, *Raphus solitarius*, que viveu na ilha Reunião. Ambas são espécies extintas.

Fonte: Amabis (1990).

Sua extinção deveu-se aos seguintes fatores: a caça movida pelos marinheiros holandeses, que os usavam como alimento, e a introdução de porcos e macacos na ilha. Os porcos atacavam os ninhos das aves, construídos no chão, e comiam os filhotes, e os macacos consumiam seus ovos (Martho & Martho, 1993).

Embora não se tenha notícia, neste caso, de que o desaparecimento dos Dodos tenha causado qualquer transtorno ecológico, a extinção de uma espécie, como esta, não deixa de constituir, pelo menos, uma agressão às gerações futuras. Fomos privados do nosso direito de conhecer os Dodos, assim como as gerações que nos sucederão serão privadas, talvez, de conhecer animais como elefantes e baleias (Martho & Martho, 1993).

3. ESPÉCIES EM PERIGO

Existem animais em vastos continentes que também estão em perigo de extinção. É o caso dos tigres, que antes vagavam pela Rússia. Só a subespécie amur resta agora na Sibéria, e sua população já diminuiu para apenas 180 a 200 exemplares. Consta que os tigres do sul da China não passam de 30 a 80. Na Indochina, esses animais correm o risco de serem extintos dentro de dez anos. Na Índia, habitat de aproximadamente dois terços dos tigres do planeta, as autoridades

calculam que essas majestosas criaturas poderão ser extintas em uma década (URL www.maara.gov.br).

O número de rinocerontes e guepardos está em declínio. Na China, os pandas-gigantes vagam em grupos de apenas dez animais. A marta vulgar está quase extinta no País de Gales, e o esquilo comum "pode desaparecer da Inglaterra e do País de Gales nos próximos 10 a 20 anos", diz *The Times*. Do outro lado do Atlântico, nos Estados Unidos, o morcego é o mamífero terrestre mais ameaçado de extinção (URL www.maara.gov.br).

A situação nos oceanos não é menos desoladora. *The Atlas of Endangered Species* (Atlas das Espécies em Extinção) classifica as tartarugas marinhas de "talvez o grupo mais ameaçado de extinção" dentre as criaturas marinhas. Os anfíbios parecem estar em melhor situação; no entanto, 89 espécies de anfíbios chegaram a estar em "perigo de extinção" nos últimos 25 anos. Cerca de 11% das espécies de aves no planeta também estão ameaçadas de extinção (URL www.maara.gov.br).

E as criaturas menores, como as borboletas? A situação é semelhante. Mais de um quarto das 400 espécies de borboleta na Europa estão em perigo, 19 das quais acham-se ameaçadas de extinção iminente. A enorme *Nymphalis polychloros*, uma borboleta da Grã-Bretanha, juntou-se ao Dodo, em 1993, na lista de espécies extintas (URL www.maara.gov.br).

4. AUMENTA A PREOCUPAÇÃO

Quantas espécies se tornam extintas todo ano? A resposta depende do especialista consultado. Embora nisso haja divergência entre os cientistas, todos aceitam o fato de que muitas espécies estão em perigo de extinção. O ecologista Stuart Pimm diz: "A controvérsia em torno da rapidez com que estamos perdendo espécies é fundamentalmente um debate sobre o nosso futuro." E ainda: "Nos últimos séculos, aceleramos a taxa de extinção das espécies, deixando-a bem além da taxa natural. Nosso futuro será mais pobre em consequência disso" (URL www.maara.gov.br).

Nosso planeta, a Terra, é como uma casa. Algumas das pessoas que se importam com as espécies ameaçadas de extinção estudam ecologia, termo cunhado em fins do século XIX, a partir da palavra grega *oikos*, "uma casa". Esse campo de interesse focaliza as relações entre os seres vivos e o meio ambiente. No século XIX surgiu um crescente interesse pela preservação das espécies, provavelmente intensificado por relatos sobre a extinção de certas espécies. Nos Estados Unidos, isso levou à criação de parques nacionais e áreas protegidas que são verdadeiros santuários para os animais. Atualmente, calcula-se que existam no mundo todo 8.000 áreas de proteção da vida selvagem reconhecidas em nível internacional. Junto com outros 40.000 locais que ajudam a preservar o habitat, elas constituem aproximadamente 10% da superfície terrestre do planeta (URL www.maara.gov.br).



Fig. 2. Águia Americana: espécie já esteve ameaçada de extinção.

Fonte: Compugrafic (2000).

Muitos interessados nessa questão agora aderem às chamadas causas verdes, quer em movimentos que divulgam as ameaças de extinção, quer em movimentos que simplesmente instruem as pessoas a respeito da interdependência dos seres vivos. E, desde a *Cúpula da Terra*, realizada no Rio de Janeiro em 1992, uma das características gerais da política dos governos é uma maior conscientização em torno das questões ambientais (URL www.maara.gov.br).

O problema da extinção das espécies é global e está crescendo. Mas por quê? Será que alguma das tentativas de impedir a extinção de certas espécies, como a águia Americana da Fig. 2, está sendo bem-sucedida? E o futuro? Os artigos que se seguem darão respostas a essas perguntas.

5. PRESERVAÇÃO VERSUS EXTINÇÃO

A Batalha entre preservação e extinção continua intensa. Muitas entidades de proteção aos animais pressionam os governos a adotar leis de preservação mais rigorosas, para a proteção das espécies ameaçadas de extinção (URL www.maara.gov.br).

Recentemente, por exemplo, vários grupos reuniram-se com autoridades chinesas e conseguiram sua cooperação em esforços para pôr fim à captura dos ursos negros tibetanos. Esses animais eram capturados para a extração da biliar e da vesícula biliar, utilizadas na medicina tradicional do Oriente (URL www.maara.gov.br).

6. AJUDA INTERNACIONAL

Proteger uma espécie num país, mas caçá-la até à extinção em outros lugares, é um mau sinal no que diz respeito à sua preservação. É por esse motivo que os acordos internacionais vieram na hora certa. A *Convenção Sobre Biodiversidade*, o Tratado do Rio, entrou em vigor no fim de 1993. Alguns dias depois passou a vigorar o *Acordo Para a Preservação dos Morcegos* na Europa. A *Comissão Internacional da Baleia* criou um santuário de baleias no oceano Antártico, além do que já existia no oceano Índico, no esforço de proteger baleias grandes e baleias mink. Mas o acordo de mais peso talvez seja a *Convenção Sobre Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Extinção*. É uma arma poderosa na luta contra o tráfico ilegal de espécies em extinção. Peles de leopardo, presas de elefante, ossos de tigre, chifres de rinoceronte e tartarugas são alguns dos produtos cujo comércio está proibido. O acordo inclui ainda madeira e peixes também ameaçados de extinção (URL www.maara.gov.br).

O homem ainda tem muito a aprender sobre a relação de uma criatura com outras no reino animal. Os pescadores da África Oriental que introduziram a perca-do-nilo no lago Vitória, a fim de incrementar suprimentos de alimento, desencadearam o que o zoólogo Colin Tudge chamou de "o maior desastre ecológico deste século". Cerca de 200 das 300 espécies de peixes nativos daquele lago foram extintas. Embora recentemente se tenham apresentado provas que põe na erosão do

solo a culpa pelos transtornos causados ao equilíbrio das espécies, agora os governos dos três países, que têm fronteiras no lago, criaram uma organização cujo objetivo é determinar que espécies de peixe podem ser introduzidas no lago sem pôr em perigo as espécies nativas (URL www.maara.gov.br).

7. ANIMAIS EM PERIGO X ANIMAIS EM EXTINÇÃO

Os animais em perigo nem sempre estão necessariamente ameaçados de extinção. Segundo o livro *Endangered Species-Elephants* (Espécies em Extinção: Elefantes), entre 1979 e 1989, o número de elefantes africanos diminuiu de 1.300.000 para 609.000, parte disso em resultado da caça ilegal para a extração do marfim. Em seguida, a pressão do público pela proibição do comércio do marfim aumentou. No entanto, a oposição à proibição do comércio de marfim ficou clamorosa (URL www.maara.gov.br).

Tanto no Zimbábue como na África do Sul, a política de preservação foi tão bem-sucedida que os parques nacionais e reservas ecológicas ficaram com um número demasiadamente grande de elefantes. Na região do Zimbábue foi preciso remover 5.000 elefantes do Parque Nacional de Hwange. A recomendação de grupos conservacionistas era a transferência dos animais. As autoridades dos parques puseram os elefantes excedentes à venda e sugeriram que as entidades ocidentais que se opunham a que eles fossem sacrificados 'pussem a mão na massa, financeiramente falando, e os transferissem' (URL www.maara.gov.br).

Só que ocorrem falhas. Muita gente se mostra preocupada com a situação difícil das espécies reintegradas na vida selvagem. O tigre-siberiano sobrevive bem em cativeiro, mas em liberdade ele necessita de cerca de 260 quilômetros quadrados de floresta, sem caçadores ilegais. E, como diz a revista *The Independent on Sunday*, "ponha direto nesse habitat um tigre criado num zoológico, e é quase certo que ele morrerá de fome" (URL www.maara.gov.br).

A realidade é que nem toda espécie conta com uma equipe especializada de protetores. E não é só a falta de potencial humano que complica o problema. Então, é preciso ter uma solução para o problema das espécies ameaçadas de extinção (URL www.maara.gov.br).

8. COMO RESOLVER O PROBLEMA

Tigres, tartarugas, rinocerontes, borboletas. A lista das espécies em extinção parece não ter fim. É comprovada que realmente cabe ao homem grande parcela da culpa.

Em vista da situação econômica do mundo, será razoável esperar que quem tem de preocupar-se com o seu próprio bem-estar dê apoio a programas de preservação de espécies, por mais nobres que sejam? Não é nada fácil apoiar a causa verde na maior parte da África subsaariana, onde milhões de pessoas passam por distúrbios políticos, guerras tribais, fome e doenças epidêmicas. A situação é a mesma em outros lugares (URL www.maara.gov.br).

Para que o problema da extinção das espécies seja resolvido é preciso efetuar mudanças radicais. De acordo com *The Atlas of Endangered Species*, essas mudanças são "de tal magnitude que só podem ser feitas por governos". Por isso ele recomendou que nos países em que os governos são eleitos, é responsabilidade de todo indivíduo garantir que, até o ano 2000, só políticos interessados no meio ambiente sejam eleitos. Não é realístico esperar isso. Muitos conservacionistas crêem que a flora e a fauna terrestres servem de indicadores ambientais. Quando elas estão ameaçadas, nós, humanos, também estamos. Mas essa não é a primeira vez na história humana em que todas as formas de vida na Terra se vêem ameaçadas de extinção.

9. INTERVENÇÃO HUMANA – A REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Um campo em que se relata sucesso é o programa de reprodução de animais em cativeiro, desenvolvido por muitos zoológicos. "Se todos os zoológicos do mundo realmente investissem na reprodução em cativeiro, e se o público investisse nos zoológicos, juntos eles salvariam todas as espécies de vertebrados que, conforme se prevê, provavelmente precisarão da reprodução em cativeiro no futuro." - *Last Animals at the Zoo* (Os Últimos Animais no Zoológico) (URL www.maara.gov.br).

O zoológico da pequenina ilha britânica de Jersey faz a reprodução em cativeiro de animais raros, com o objetivo de reintegrá-los na vida selvagem posteriormente. Em 1975, restavam apenas 100 papagaios de Sta. Lúcia em seu habitat, no Caribe. Sete deles foram enviados para Jersey. Até 1989, o zoológico já₁₃

havia conseguido mais 14 exemplares, graças à reprodução em cativeiro, e devolvidos alguns deles ao seu habitat em Sta. Lúcia. Relata-se que mais de 300 desses papagaios agora embelezam a natureza nessa ilha (URL www.maara.gov.br).

Providências similares têm sido bem-sucedidas em outros lugares. A revista *National Geographic* diz que os 17 lobos-vermelhos que restavam na América do Norte reproduziram-se tão bem em cativeiro que mais de 60 já foram devolvidos à vida selvagem (URL www.maara.gov.br).

10. PROCESSO NATURAL DE FERTILIZAÇÃO

10.1. O ovócito

Naturalmente, os ovócitos dos mamíferos não completam toda sua maturação (divisão meiótica) de uma só vez, mas interrompem seu desenvolvimento ainda dentro do ovário no estágio de vesícula germinativa, na prófase I da meiose (Yanagimachi, 1988). O reinício do processo de divisão meiótica só acontecerá pouco antes da ovulação, quando um conjunto de eventos que envolvem o hormônio luteinizante (LH) e desbloqueio de fatores inibidores da meiose, ativam o folículo pré-ovulatório.

Depois de reiniciada a divisão, esta se desenvolverá até o estágio de metáfase II, quando o ovócito novamente paralisa seu processo divisional que só será reativado com a entrada do espermatozóide na célula. A ativação é portanto o requisito fundamental para a condensação da informação genética contida na cabeça do espermatozóide e a formação do pró-núcleo masculino e maior indicador da fertilização. A maturação *in vivo* envolve componentes endócrinos e sinalizadores, que devem ser garantidos também nas manipulações *in vitro* (Gómez *et al.*, 1998). Incluindo condensação nuclear, ativação protéica e íons, como o cálcio, diversas modificações morfológicas e metabólicas estão envolvidas.

10.2. O espermatozóide

Durante o coito, milhões de espermatozoides são depositados na vagina

(coelho, ovelha, bovino e humanos) ou diretamente no útero (camundongos, cães, eqüinos e suínos). As junções útero-tubárica e o istmo (ampola que corresponde a cerca da metade do comprimento da tuba), são barreiras naturais para a regulação do acesso dos espermatozóides móveis, e estes podem ser estocados nestes pontos, ou mesmo no útero. Nas espécies que depositam o sêmen na vagina, o canal cervical é a primeira seleção sofrida pelos espermatozóides. Naturalmente, o número de espermatozóides que atingem o ovócito é muito pequeno, sendo não mais que 50 em bovinos, 200 em humanos e assim variando entre as espécies (Yanagimachi, 1988).

Os principais eventos necessários para o espermatozóide ser considerado apto à fertilização, são a capacitação, a reação acrossomal e a hiperativação. A capacitação envolve modificações intracelulares e bioquímicas, e alterações de membrana plasmática que ocorrem durante o trajeto no trato genital feminino, possibilitando ao espermatozóide realizar a reação acrossômica (Yanagimachi, 1988). A reação acrossômica é a exocitose cálcio-estimulada que envolve as membranas da cabeça do espermatozóide, e tem seu início no espermatozóide fertilizador quando próximo ou mesmo após o contato com o ovócito. A etapa final, a hiperativação do espermatozóide, ocorre quase simultaneamente com a reação acrossomal, e às vezes antes desta quando ativados *in vitro*. Envolve modificação de componentes de membrana, mas sua função para o espermatozóide não é totalmente clara, parecendo estar associada com a liberação do espermatozóide do istmo, e também com a capacidade de penetração através das células do *cumulus* e da zona pelúcida do ovócito (Yanagimachi, 1988).

10.3. Fertilização

Na fertilização, o espermatozóide capacitado liga-se à zona pelúcida do ovócito, sofre a reação acrossomal e hiperativação. Após o início da fusão, o espermatozóide torna-se imóvel e sua membrana plasmática é incorporada à membrana do ovócito, ativando as fosfolipases componentes. A hiperpolarização da membrana é o primeiro sinal da ligação espermatozóide-ovo, sendo seguida imediatamente da liberação de cálcio dos estoques internos localizados no retículo endoplasmático do ovócito (Gómez *et al.*, 1998). Há ainda o influxo de Ca^{2+} do meio se este for disponível, e a alta concentração deste íon promove então a ativação de

enzimas e segundos mensageiros, responsáveis pelo estímulo de finalização da divisão celular do ovócito e ativação da metáfase II (Edwards, 1995). Na insuficiência de Ca^{2+} no meio, a ativação não pode ser continuada.

A liberação de grânulos corticais pelo ovócito é um dos mecanismos induzidos pela alta concentração de cálcio, e tem função de bloqueio à polispermia. A organização da cromatina e fusão dos pró-núcleos masculino e feminino, leva um tempo variável entre as espécies, bem como o início das clivagens do núcleo então diplóide (Gómez *et al.*, 1998).

10.4. Principais causas de infertilidade no macho

Segundo Kretser (1995), os problemas de infertilidade estão divididos em diferentes categorias, tanto de origem adquirida quanto congênita e genética. A infertilidade de espermatogênese normal, envolve as lesões obstrutivas de epidídimo, vaso deferente ou ducto ejaculatório, ausência do vaso deferente, anormalidade e hostilidade do ambiente epididimário de causa desconhecida, e ainda a falha na ligação do espermatozóide com o ovócito, impossibilitando a fertilização. A espermatogênese normal com espermatozóide anormal, inclui ausência de acrossoma, defeitos do axonema, das fibras ou mitocôndrias da peça intermediária e falhas na condensação da cromatina. Outra categoria de defeitos, são as de baixa produção de espermatozóides, ou hipoespermatogênese, de causas diversas. Em todos estes casos, o espermatozóide está presente e sua utilização pode ser viabilizada.

Em bovinos, as principais causas adquiridas de infertilidade são: nutrição inadequada (obesidade ou fome), anormalidades esqueléticas, problemas nos pés (pododermatite, laminite), inflamações diversas no sistema locomotor. Problemas com a genitália externa são também comuns, como a hidrocele, ruptura da barreira testicular, orquite, prolapso, fibrose e lacerações de prepúcio, hematoma, desvio e flacidez penianos, dessensibilização nervosa da glândula do pênis, inflamações e infecções das glândulas sexuais acessórias (Van Camp, 1997).

Dentre as mais comuns causas genéticas de infertilidade estão: translocações cromossômicas, espermatozóides diplóides, defeitos de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda do espermatozóide, criptorquidismo, hérnia inguinal, hipoplasia testicular, hipoplasia de vesícula seminal, persistência de *frenulum* peniano

(Steffen, 1997).

No entanto, em algumas patologias há a ausência completa do espermatozóide (azospermia), como a cessação da espermatogênese, mais comum na fase de espermatogônia e espermatócito primário, a aplasia de células germinativas, a hialinização de túbulos seminíferos e imaturidade testicular, por deficiência de estímulo hormonal (Kretser, 1995). Este tipo de deficiência, estimulou trabalhos com a utilização de gametas em desenvolvimento.

11. A BIOTECNOLOGIA

11.1. A ciência Precursora

A Biotecnologia é a integração das novas técnicas decorrentes da moderna biotecnologia às abordagens bem estabelecidas da biotecnologia tradicional (Agenda 21, 1995).

A Biotecnologia, um campo emergente com grande concentração de conhecimento, é um conjunto de técnicas que possibilitam a realização, pelo homem, de mudanças animais, vegetais e sistemas microbianos, conducentes a produtos e tecnologias úteis. Em si mesma a biotecnologia não pode resolver todos os problemas fundamentais do meio ambiente e do desenvolvimento mais pode contribuir muito para a melhoria deles, como por exemplo: melhor atendimento da saúde, maior segurança alimentar por meios de práticas agrícola sustentáveis, melhor abastecimento de água potável, maior eficiência nos processos de desenvolvimento industrial para transformação de matérias-primas, apoio para métodos sustentáveis de florestamento e reflorestamento, e a desintoxicação dos resíduos perigosos (Agenda 21, 1995).

A biotecnologia também oferece novas oportunidades de parceria globais, especialmente entre países ricos em recursos biológicos (que incluem os recursos genéticos) mas carentes da capacitação e dos investimentos necessários para a aplicação desses recursos por meio da biotecnologia e países que desenvolveram a capacitação tecnológica necessária do desenvolvimento sustentável. A biotecnologia pode contribuir para a conservação de tais recursos por meio, por exemplo, de técnicas *ex situ* (Agenda 21, 1995).

A utilização de métodos biológicos de manipulação de seres vivos – animais, vegetais e microorganismos – na conservação, produção e desenvolvimento de recursos naturais tem sido, desde tempos remotos, uma das formas mais importantes de intervenção da inteligência humana na otimização de sistemas de informação criados pela própria natureza. A finalidade desta intervenção é aumentar a eficiência do desempenho dos seres vivos, torná-los mais produtivos e alterar suas características originais para incorporar-lhes requisitos que maximizem a capacidade estrutural e funcional de seus princípios (Pavan *et al.*, 1986).

No Brasil, a aplicação das ciências biológicas com tal finalidade remonta a meados do século passado. Notadamente, técnicas laboratoriais e de campo em microbiologia – uma disciplina precursora da moderna biotecnologia – foram aplicadas por pesquisadores de grande valor (Pavan, 1986).

12. BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL

12.1. Inseminação Artificial (IA)

A inseminação artificial (IA) é a técnica singular mais importante já idealizada para o melhoramento genético dos animais. Já foram desenvolvidos métodos para IA em bovinos, ovinos, caprinos, suínos, eqüinos, cães, gatos, aves domésticas, uma variedade de animais de laboratório e insetos (Hafez, 1995). IA em animais domésticos oferece várias vantagens pelo melhoramento genético, controle de doenças e aspectos econômicos (Hafez, 1995).

A documentação cuidadosa mais antiga sobre a utilização desta técnica surgiu em 1780 quando Spallanzani, um fisiologista italiano, conseguiu o nascimento de cães por este método. Outras comunicações esporádicas aparecem no século XIX, porém somente a partir de 1900 é que começaram estudos extensos com animais domésticos na Rússia e logo após no Japão (Hafez, 1995).

A inseminação artificial é uma poderosa ferramenta da veterinária para multiplicar o rebanho de gado. Funciona tão bem que 4% dos bovinos do Brasil nasceram de sêmen congelado. De acordo com a Divisão de Fiscalização de Materiais de Multiplicação Animal – DFIMA, do Ministério da Agricultura, a tecnologia utilizada no setor de inseminação artificial em bovinos no país é de alto nível. Essa

visão do Ministério se confirma em contato estabelecido com firmas e técnicos ligados ao setor de inseminação (Pavan, 1986).

Seria excelente se a técnica tivesse a mesma eficiência com animais silvestres ameaçados de extinção. Infelizmente não é o que ocorre. Estima-se que as experiências desse tipo bem-sucedidas não ultrapassem uma dezena pois esta técnica é bem conhecida apenas em animais domesticados. O problema é que os cientistas não conhecem suficientemente bem a fisiologia de todos os animais nem como funciona o processo de ovulação e gestação das fêmeas. Apesar de haver características reprodutivas análogas entre as espécies, cada uma delas tem peculiaridades ainda não compreendidas (Veja, editora Abril, 2001). O outro problema, na opinião dos técnicos, que estaria dificultando a difusão da inseminação artificial em maior escala, seria a falta de mão-de-obra especializada no setor bem como pessoas treinadas para a difusão da técnica (Pavan *et al.*, 1986).

Segundo informações obtidas junto a técnicos e pesquisadores envolvidos com a inseminação artificial em bovinos, essa técnica teve um crescimento rápido na década de 70, tendo atingido o auge nos anos de 1975 e 1976 (Pavan *et al.*, 1986).



Fig. 3 Thor: Águia Européia nascida pela técnica de IA.

Foto: AFP/BIOS (2001).

Mas, apesar dos estudos com animais silvestres ainda não estar tão evoluído como nos animais domésticos, pesquisadores escoceses anunciaram uma vitória: conseguiram reproduzir uma rara águia européia, espécie da qual existem hoje

apenas 850 exemplares nas ilhas britânicas. Batizado de “Thor”, o filhote foi gerado a partir de sêmen guardado em um banco genético. Thor, que aparece na figura 3, é apenas a terceira ave de rapina a ser reproduzida com ajuda da IA. O sêmen do macho foi descongelado e aplicado diretamente no órgão reprodutivo da fêmea, como se faz com o gado (Veja, editora Abril, 2001).

A produção de sêmen de alta qualidade depende de reprodutores que são mantidos sob boas condições. Quando os machos jovens são adequadamente alimentados e manejados, o sêmen pode ser colhido satisfatoriamente (Hafez, 1995).

A colheita do sêmen pode ser feita com ajuda de manequins (vagina artificial) e procedimentos de excitação (eletroejaculador ou massagens). Segundo Hafez (1995), a vagina artificial é feita de material emborrachado e esta, estimula a cópula natural. O eletroejaculador é um eletrodo que é introduzido no reto do animal, e que através de estímulos elétricos, estimula a ereção peniana e conseqüentemente a ejaculação. Esses métodos são utilizados com sucesso em mamíferos. Em aves, o macho é estimulado com massagens rítmicas na porção caudal externa do corpo, onde em seguida o sêmen é recolhido.

Para saber o momento certo da IA é preciso observar a hora do cio, ou seja, a próxima ovulação. Então é necessário observar o comportamento do animal. As fêmeas não devem ser inseminadas após o parto até que o útero volte ao lugar. Vários procedimentos são aplicados para inseminação das várias espécies (Hafez, 1995)

12.2. Fertilização *in vitro* (FIV)

A fertilização ou fecundação *in vitro* (FIV) é considerada a terceira geração de biotecnologia da reprodução, após a inseminação artificial e a transferência de embriões (Thibier, 1990). Ela afirmou-se e progrediu rapidamente nestes últimos anos em mamíferos (Bem, *et al.*, 1994).

A FIV vem se mostrando como uma biotecnologia promissora tanto na embriologia básica como na produção animal. Os estudos básicos da técnica *in vitro* têm contribuído decisivamente para uma maior compreensão dos eventos da ovogênese, da fecundação, do desenvolvimento e da implantação de embriões, demonstrando o potencial desta tecnologia (Bem, *et al.*, 1994).

Os primeiros estudos sistemáticos de fertilização de ovócitos de coelha *in*

vitro por espermatozóides recuperados do trato feminino foram comunicados por Dauzier *et al.* (1954) e Thibault e Dauzier (1960, 1961). O desenvolvimento e aplicação da FIV em animais domésticos foram revistos extensivamente por Wright e Bondioli (1981). A FIV é de significado prático para obter grande número de embriões para investigações científicas ou para transferência subsequente a receptoras apropriadas (Hafez, 1995).

Em bovinos, o primeiro bezerro nascido de FIV a partir de um ovócito, cuja maturação foi realizada *in vitro*, nasceu em 1981. A maturação é essencial no processo de FIV pois é onde o ovócito adquire capacidade para ser posteriormente fecundado. Assim, a maturação dos ovócitos depende da eficiência do método de colheita e principalmente do método de maturação *in vitro*, pois somente os ovócitos maturados nuclear e citoplasmaticamente poderão ser fecundados (Brackett *et al.*, 1982).

A possibilidade de formação de bancos de ovócitos congelados e o posterior descongelamento e fecundação dos mesmos, abre novas alternativas e dá maior flexibilidade aos programas de conservação de recursos genéticos animais (Bem, 1996).

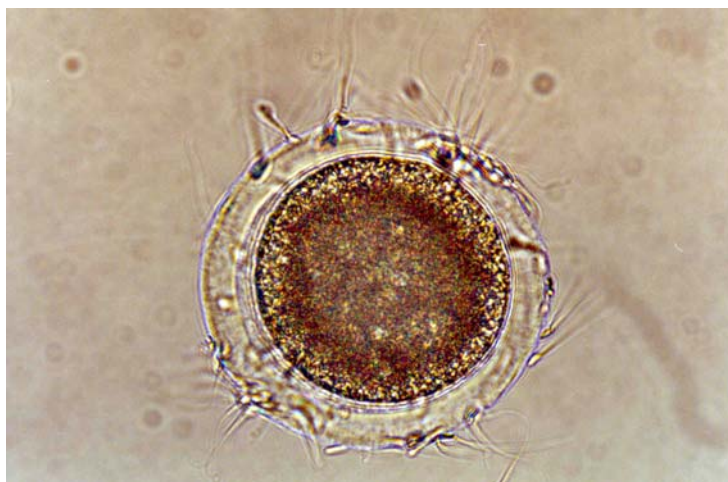


Fig. 4 Ovócito bovino na FIV com espermatozóides aderidos.

Fonte: Embrapa/Cenargen (2000)

O processo de fertilização, da maneira como ocorre no oviduto, é extremamente complexo e envolve interações específicas entre os gametas masculinos e femininos para formar um indivíduo diplóide, o zigoto, o qual em seu devido tempo irá se desenvolver até um novo ser (Bem, 1996).

O termo fertilização *in vitro* tem sido adotado como uma forma genérica para

expressar os processos que incluem a maturação (MIV), a fertilização (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) (Bem, 1996).

Hoje em dia o termo produção *in vitro* (PIV) de embriões tem sido utilizado para definir os três processos (MIV, FIV e CIV) normalmente desenvolvidos em seqüência para produção de embriões exclusivamente *in vitro*. A PIV de embriões tem sido utilizada em humanos em todo o mundo, na tentativa de solucionar problemas de infertilidade tanto masculina como feminina, sendo esta também, a principal indicação para o uso destas técnicas em outros tipos de mamíferos (Bem, 1996).

Segundo Bem *et al.*, (1994), o processo de FIV inicia-se com a punção folicular (PIV) guiada por um sonda (ultra-som), onde uma agulha é introduzida pela vagina do animal. Os folículos poderão ser observado na tela do aparelho. Assim, permite-se coletar, de forma repetida, os ovócitos intra-ovarianos.

Os ovócitos obtidos, são em seguida maturados, fecundados e cultivados *in vitro* (Fig. 4) até a obtenção de embriões viáveis (Fig.5), que são em seguida, transferidos para as receptoras síncronas (Bem, *et al.*, 1994).

O coelho foi a primeira espécie de mamífero da qual obteve-se descendência utilizando-se procedimento *in vitro* (Chang, 1955). Subseqüentemente obteve-se sucesso em camundongos (Wittihgham, 1977) e gado bovino (Iritani & Niwa, 1977), e desde então as pesquisas envolvendo PIV de embriões têm crescido dramaticamente.



Fig. 5 Embrião bovino de 7 dias em eclosão (saindo da zona pelúcida).

Fonte: Embrapa/Cenargen (2001).

Algumas centenas de animais, de todas as espécies, incluindo-se primatas e outros animais silvestres, nascidos de FIV, valorizaram esta técnica. No entanto, o rendimento ainda é muito baixo considerando que os embriões produzidos *in vitro* suportam mal o congelamento. Sem dúvidas que os resultados vão melhorar, principalmente com novos meios de cultivo (Rumpf *et al.*, 1994).

Cientistas do zoológico de Omaha, nos Estados Unidos, conseguiram produzir um tigre-de-bengala por fertilização *in vitro* em 1991. As dificuldades encontradas em repetir a experiência com a onça pintada são devido às peculiaridades que cada espécie possui e ainda não são compreendidas. Os cientistas da Universidade de São Paulo que tentam reproduzir nosso maior felino ainda não superaram todos os obstáculos. A maior dificuldade está em determinar aspectos básicos, como a frequência do cio e a idade exata da maturidade sexual das onças. As técnicas usadas por veterinários brasileiros para produzir artificialmente um filhote de onça pintada são idênticas às que geram bebês de prole humana. Para obter os embriões, os pesquisadores estimularam as fêmeas a aumentar a produção de ovócitos e selecionaram os melhores espermatozoides colhidos do macho. A fecundação foi feita *in vitro*. Agora precisam aprender como se induz a gravidez nas onças e qual a receita biológica para fixar o embrião no útero da fêmea (Veja, editora Abril, 2001).

A equipe da USP acredita ter avançado até a metade do caminho. Segundo o veterinário Ronaldo Morato da USP, eles já conseguiram produzir seis embriões e pretendem implantá-los este ano em duas fêmeas (Veja, editora Abril, 2001).

12.3. Transferência de embriões (T.E.) ou Inovulação

A Transferência de Embriões (TE) foi a primeira das modernas tecnologias a ser incrementada a campo com o gado. Mas para a utilização de tal técnica, é necessário que haja um aprendizado e domínio da Inseminação Artificial (IA) (Bem *et al.*, 1997).

A Transferência de Embriões (TE) consiste na estimulação hormonal dos ovários de um animal doador, para induzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos simultaneamente. De seis a oito dias após a fecundação natural ou a inseminação artificial, no caso de bovinos, os embriões são coletados através de uma lavagem uterina e transferidos para outros animais receptores, que levarão a

gestação a termo (Bem *et al.*, 1997).

O termo transferência de embriões constitui de um leque de várias técnicas que se iniciam com a seleção dos animais até a inovulação. Inovulação é um termo técnico, e consiste na deposição do embrião de um animal doador para o útero de um outro receptor, quer seja pelo método cirúrgico ou transcervical (Bem *et al.*, 1997).

A TE é uma técnica usada em diversos tipos de mamíferos, sendo que seus melhores resultados são com animais domesticados (bovinos, caprinos e suínos) (Hafez, 1995). Porém, a TE está sendo utilizada em espécies de animais silvestres em cativeiro que se encontram em ameaça de extinção.

Para se ter um programa de TE nas espécies de mamífero em geral, faz-se necessário:

- Conhecimento morfológico e fisiológico da espécie a se trabalhar;
- Indução ovariana com ajuda de hormônios do animal doador durante o cio;
- Inseminação da doadora e preparação da receptora;
- Colheita dos embriões na doadora;
- Transferência do embrião para a receptora (Hafez, 1995).

A primeira transferência embrionária feita com sucesso foi comunicada em coelhas. As primeiras transferências embrionárias em animais domésticos também com sucesso foram comunicadas durante a década de 1970 (Pavan *et al.*, 1995).

Segundo Hafez (1995), a ovulação nos mamíferos em geral pode ocorrer espontaneamente ou como um reflexo a um estímulo. A coelha, a fêmea do furão, a gata e a fêmea do mussaranho não ovulam espontaneamente. Na coelha, a ovulação ocorre 10 a 13 horas após a cópula ou após algum outro estímulo, por exemplo, injeção de hormônio LH, sais ou cobre, estímulo elétrico ou orgasmo provocado pelo contato de outras fêmeas. O momento da ovulação é estimado em relação ao tempo do início do cio. Nota-se diferença entre espécies quanto às características do ciclo estral, mecanismos de ovulação, hora de ovulação, viabilidade do ovo e estágios embrionários (Hafez, 1995).

Houve várias limitações no desenvolvimento das técnicas de transferência de embriões em uma escala prática comparável à inseminação artificial. Anteriormente, não haviam métodos seguros de superovulação e produção de óvulos fertilizados em grande escala, não havendo também uma técnica não cirúrgica simples para colheita

de embriões. Alguns destes problemas estão sendo resolvidos e a transferência de embriões, como a IA, pode apresentar um significativo papel na reprodução animal (Hafez, 1995).

Segundo Hafez (1995), TE pode ser feita de duas maneiras: Transferência não-cirúrgica e transferência cirúrgica.

12.3.1. Transferência não-cirúrgica

Resultados de TE em bovinos não-cirúrgica foram resumidos por Foote e Onuma (1970). Com a técnica desenvolvida por Sugie (1965), a cérvix não é transpassada. Corretamente, o método mais comum é depositar os ovos no útero através da cérvix com uma palheta de IA, 6 a 12 dias após o cio (Sreenan, 1978; Trounson *et al.*, 1978a).

A técnica para inovulação não cirúrgica segue os seguintes passos:

- Boa contenção do animal;
- Exame do ovário contendo o corpo lúteo;
- Anestesia epidural baixa;
- Introdução do inovulador no útero;
- Deposição do embrião na junção útero-tubária (Rumpf, *et al.*, 1998).

12.3.2. Transferência Cirúrgica

Os embriões geralmente são transferidos cirurgicamente. A laparoscopia medioventral sob anestesia geral é o método mais comum. O trato reprodutivo é exposto como para a colheita de ovos. Na transferência para as tubas, a extremidade de uma pipeta capilar contendo os embriões é inserida dentro do infundíbulo e ampola da tuba, onde os embriões são então depositados em uma ou duas gotas do meio. Quando a transferência é feita para o útero, a parede do corpo uterino é puncionada com uma agulha de ponta romba e os embriões são expelidos da extremidade da pipeta capilar inserida dentro da luz uterina (Hafez, 1995).

Atualmente, cada coleta em bovinos, em média, responde com quatro bons embriões congeláveis ou transferíveis; estes embriões quando inovulados resultam em duas gestações. Na melhor das hipóteses, em média, uma vaca pode produzir por ano,

quinze produtos (Bem *et al.*, 1997).

Os testes de progênie, principalmente nos países desenvolvidos, têm sido o enfoque principal para escolha dos reprodutores e/ou matrizes num programa de TE e, neste caso, são avaliados dados como: peso ao nascer, peso após a desmama, ganho de peso, rendimento de carcaça, habilidade materna e produção (Bem *et al.*, 1997).

Para se fazer um programa de TE, segundo (Rumpf *et al.*, 1998), os animais escolhidos devem estar entre os mais puros (10 a 20% de um criatório elitizado). Outra observação importante é avaliar a fertilidade da fêmea pelo estudo de seu passado reprodutivo e se tem boa condição corporal.

O principal objetivo da TE é aumentar o número de produtos geneticamente superiores, a partir de doadores (machos e fêmeas), previamente selecionados (Rumpf *et al.*, 1998).

Outro importante objetivo é a preservação de animais em perigo de extinção cujo valor genético não foi estudado, é uma necessidade importante. Em animais domesticados como nos (bovinos, suínos, eqüinos e ovinos) existem linhagens cujas características zootécnicas conhecidas serão de grande valia para utilização futura. Características como adaptabilidade, rusticidade, prolificidade, resistência e/ou tolerância a doenças e parasitas, são comuns nessas raças “locais” que sofreram uma intensa seleção natural através dos séculos (Rumpf *et al.*, 1998).

12.4. Criopreservação ou Vitrificação

A preservação das estruturas gaméticas através do resfriamento ou congelamento, denominada de criopreservação, foi um dos eventos que mais contribuiu para a difusão do ganho e melhoramento genético, e para o estudo aprofundado das diferentes raças e espécies bovinas. A partir do primeiro relato do nascimento de animais normais de ovócitos criopreservados de camundongos (Whittingham *et al.*, 1972), diversas outras espécies começaram a ser testadas. No entanto, percebeu-se que o abaixamento da temperatura, em qualquer grau, afeta de forma muito mais drástica o ovócito bovino, em relação ao de outras espécies de mamíferos (Arav *et al.*, 1996). Os efeitos do abaixamento da temperatura alteram de forma significativa tanto aspectos morfológicos quanto genéticos do ovócito, levando a taxas de fertilização e desenvolvimento a ficarem comprometidas (Schellander, 1988). Nos últimos 15 anos, apesar do grande número de pesquisas nesta área, os progressos realizados podem

ser considerados modestos, estando a eficiência da técnica abaixo de 65% dos resultados conseguidos com ovócitos não criopreservados.

Segundo Vatja, 1998, diversas metodologias foram testadas até hoje e mais recente, a vitrificação tem despontado como um caminho bastante promissor. O fenômeno da vitrificação já é conhecido por um longo tempo, mas foi inicialmente aplicado para a criopreservação pelos pesquisadores Rall & Fahy em no ano de 1985, trabalhando com embriões de camundongo. Especificamente com ovócitos, os resultados iniciais mostraram taxas de fertilização e desenvolvimento de 20 – 38% em ovócitos vitrificados (Nakagata *et al.*, 1989; Kono *et al.*, 1991; Wood *et al.*, 1991), e em média de 6 – 14% em ovócitos congelados pelo método convencional (Whittingham, 1977). Longe ainda de ser o ideal, os resultados mais recentes de aplicação da vitrificação em embriões bovinos são animadores. Além de sua simplicidade metodológica pois não utiliza equipamentos, a vitrificação possibilita um equilíbrio termodinâmico onde um mínimo de prejuízo é causado pelo frio.

O principal problema na congelação de ovócitos ou outros tipos de células e tecidos são os danos causados pela cristalização natural da água nos compartimentos intra e extracelulares durante o processo, afetando a microestrutura da membrana celular e das organelas. Os cristais são formados principalmente na descongelação, podendo ser evitados se o processo for realizado de forma rápida. O autor concluiu ainda que quanto maior a velocidade de congelação, menor seriam estes cristais, e menor a sua injúria. A desidratação parcial das células, e a alta velocidade de congelação aliadas a uma rápida descongelação seriam então a combinação ideal. Fuku *et al.*, (1992) e Otoi *et al.*, (1992) demonstraram a possibilidade de produção de embriões, gestação e inclusive nascimento de bezerros a partir de ovócitos maduros congelados pelas técnicas convencionais, utilizando abaixamento lento da temperatura. No entanto, as taxas de desenvolvimento encontradas estão abaixo de 5%, o que pode ser considerado de baixa eficiência. Já Martino *et al.*, (1996) relatou que a taxa de desenvolvimento de 40% dos ovócitos maduros tratados, e taxas de 15% de blastocistos produzidos a partir de ovócitos maduros criopreservados em sistemas de resfriamento ultra-rápido, na presença de etilenoglicol. O estudo portanto também sugere que o resfriamento dos ovócitos em taxas muito rápidas permite que eles passem muito brevemente pela faixa de temperatura crítica, que está entre + 15°C e – 15°C, minimizando os danos causados.

12.5. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI)

A injeção intracitoplasmática de espermatozóide diretamente no ovócito (ICSI), tem sido desenvolvida nas últimas duas décadas com fins experimentais e terapêuticos, e faz parte de uma série de técnicas que compõem a denominada reprodução assistida. Sua utilização é conhecida desde 1962 nos trabalhos com equinodermos e anfíbios, e o primeiro trabalho com mamíferos foi relatado por Uehara & Yanagimachi (1976), com hamsters. Seu emprego em animais domésticos é mais recente, onde tem sido fundamental no refinamento da tecnologia de fertilização, clonagem e produção de animais transgênicos.

O ser humano é a principal espécie de aplicação da ICSI, considerando-se que atualmente um terço dos problemas de infertilidade estão ligados à deficiência reprodutiva masculina (Catt, 1996). A primeira fertilização e gestação via ICSI no ser humano foi conseguida acidentalmente, por Palermo e colaboradores (1995). No entanto, a limitação ética da experimentação com gametas humanos e a incerteza das conseqüências de tal procedimento, intensificou a necessidade de uso de modelos experimentais, obrigando à expansão do emprego da técnica também para outros mamíferos, principalmente animais domésticos. Dentre os animais experimentais, os bovinos mostram uma maior proximidade aos humanos, principalmente quanto à forma de ativação do ovócito. Devido aos crescentes sucessos nos índices de fertilização, gestação e nascimento de seres normais, a possibilidade da utilização comercial em animais começa a ser discutida com mais ênfase. A abordagem exclusivamente terapêutica é desenvolvida apenas em animais de companhia, devido ao caráter de seleção de animais e custo de aplicação da técnica (Catt, 1996).

Os principais focos de aplicação da ICSI são: a obtenção de descendentes de indivíduos inférteis ou impossibilitados de fecundar após defeito adquirido; a produção de embriões fora da estação reprodutiva; a reprodução de espécies ameaçadas de extinção; a fecundação de ovócitos que falham na fertilização, como os criopreservados; a viabilização da fecundação a partir de espermatozóides sexados; produção de transgênicos e finalmente, veículo de estudo da fisiologia e da causa de infertilidade (Catt, 1996).

A ICSI, consiste na deposição de apenas um espermatozóide no interior do citoplasma do ovócito com o auxílio de uma micropipeta de vidro(Fig. 6).



Fig. 6 Etapas da ICSI

Fonte: Embrapa/Cenargen (2001)

Além de materiais de alta precisão, uma série de procedimentos são necessários para preparação tanto do ovócito quanto do espermatozóide. Do ponto de vista técnico, um dos maiores atrativos da ICSI, é a certeza de fecundação monospermica. A técnica tem ainda muito poucas restrições quanto ao tipo de sêmen utilizado, e até mesmo espermatogônias e espermátides podem levar à produção de gestação (Ogura & Yanagimachi, 1995; Sofikitis, 1998), onde no entanto os índices de fertilização e gestação são menores do que com espermatozoides maduros. A disponibilidade de espermatozoides vivos (e não necessariamente móveis), recuperados de ejaculados, epidídimo ou testículos, podem levar a elevadas taxas de fertilização (Catt, 1996).

O uso da ICSI no tratamento da infertilidade humana severa e não explicada, é ainda o maior campo de aplicação da técnica, principalmente quando nem a fertilização *in vitro* é eficaz. Schiewe *et al.*, (1996), relataram taxas de 31% de gestação em embriões produzidos por ICSI a partir de espermatozoides de pacientes com disfunção ejacutória, azospermia e/ou teratozoospermia e oligospermia.

A aplicação da ICSI para a preservação e recuperação de espécies ameaçadas de extinção pode ser uma das maiores contribuições nos animais. Kurz *et al.*, (1999), relatou a produção de cinco embriões viáveis a partir de ICSI dos ovócitos recolhidos de uma *Gorilla gorilla* que morreu. No Japão, Hosoi e colaboradores (1998), realizaram a ICSI em ovócitos de *Macaca fuscata*, mas ainda não obtiveram gestações, que no entanto foram conseguidas com a FIV.

O potencial de uso da ICSI entre duas espécies diferentes vem sendo testado. O objetivo deste enfoque visa a replicação de material genético de espécies ameaçadas de extinção, produção de espécies híbridas para gestarem outras espécies e o estudo do mecanismo de fertilização normal e infertilidade heteróloga (Ogura & Yanagimachi, 1993).

Na ausência de espermatozóides competentes para fertilizar o ovócito maduro, em animais que um dia foram férteis, ou quando ocorre morte repentina de animais de interesse para se multiplicar e conservar, é proposto que as espermátides (redondas, alongando ou alongadas) podem ser extraídas e sejam uma alternativa para produção de descendentes (Martins & Feliciano Silva, 2000). Estas células podem substituir os espermatozóides no processo de fertilização quando utilizadas pela técnica de ICSI (Ogura & Yanagimachi, 1993).

Desta forma, a ICSI utilizando-se das células espermátogênicas primordiais, espermatozóides imaturos (testicular) e maduros (epididimário e do ejaculado), torna-se uma opção e garantia biológica, principalmente para aqueles animais em programas de recuperação e preservação.

Ainda, esta técnica poderá ser utilizada para gerar embriões através de fertilização *in vitro* de animais que tiveram sua reprodução bloqueada, devido à ausência de um *habitat* natural, ou seja, encontram-se em cativeiro. Da mesma forma, animais em fase terminal de vida ou mortos acidentalmente, poderão produzir descendentes quando o material (testículo) é colhido imediatamente, processado e as células espermáticas utilizadas pela ICSI.

Em função do pouco domínio desta técnica na espécie animal, faz-se necessário o seu aprimoramento, principalmente no Brasil, uma vez que a ICSI, mesmo com os resultados a evoluir em relação aos humanos, já representa um importante instrumento para a recuperação e conservação dos recursos genéticos.

12.6. Transferência de nuclear (Clonagem)

Muitos trabalhos foram feitos sobre a transferência de nuclear (TN), principalmente em camundongos, suínos, bovinos e ovinos. Esta técnica, vulgarmente denominada clonagem, consiste na utilização de embriões, os quais, pela separação dos blastômeros, dão origem ao indivíduo primário (Smith, 1988).

Mamíferos clonados com êxito foram obtidos através da transferência nuclear a partir de núcleo doador de embriões em estádios iniciais do desenvolvimento em ovócitos enucleados maduros. A figura 7 ilustra a bezerra Vitória da raça Simental, nascida pela técnica de transferência nuclear. Apesar disto, utilizando-se da clonagem embrionária, o número potencial de nascimentos está restrito devido ao limitado

número de núcleos doadores disponíveis em células embrionárias e células diferenciadas como possíveis fontes doadoras de núcleo para transferência nuclear tiveram grandes impactos na clonagem. Em ovinos, o relato do nascimento de três proles viáveis a partir do núcleo de embriões oriundos de células epiteliais (Campbell *et al.*, 1996) gerou novas apreensões dentro da ovelha Dolly (Fig. 8) (Wilmut *et al.*, 1997). Este foi o verdadeiro início da nova área da clonagem somática em mamíferos domésticos.



Fig. 7 Vitória: primeira bezerra brasileira obtida pela transferência nuclear

Fonte: Embrapa/Cenargen

Em bovinos, a capacidade do núcleo de uma célula diferenciada em ser reprogramada após fusão com um ovócito recipiente enucleado parecia ser muito mais limitada do que a partir do núcleo de um blastômero. A transferência nuclear de células somáticas teve aumento considerável em seu interesse em vista das numerosas aplicações em potencial dentro da biotecnologia. Para a indústria de animais de produção, no entanto, é muito mais desejável a clonagem de animais adultos do que a partir de células somáticas fetais, devido à necessidade em se saber o fenótipo e a produção, ou o valor genético dos potenciais núcleos doadores antes de se efetuar a transferência nuclear. Esta condição torna-se agora possível desde que animais viáveis foram clonados a partir de células somáticas em ovinos, camundongos e bovinos, nos últimos 3 anos (Wilmut *et al.*, 1997; Wakayama *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 1999).

Com o aumento da experiência na tecnologia da transferência nuclear, parece que o sucesso da reprogramação nuclear de células somáticas depende de vários

fatores. Dentre estes fatores, acredita-se ser de grande importância a sincronização do ciclo celular entre o núcleo doador e citoplasma recipiente, assim como a origem e o grau de diferenciação das células doadoras (Heyman, 2000).

12.6.1. Clonagem Somática

Em bovinos, grande parte do melhoramento genético é alcançado através da Inseminação Artificial (IA) a partir de touros selecionados. Entretanto, o potencial de difusão de touros de alto valor pode ser interrompido por morte acidental do progenitor. A clonagem somática permite assegurar-se desse risco através da geração de uma genocópia do touro, uma vez que tenha sido provado ser superior. Recentes trabalhos na Itália demonstram ser possível o nascimento de um clone a partir de um touro idoso utilizado na IA através de células sangüíneas linfóides como fonte doadora de núcleo (Galli *et al.*, 1999).

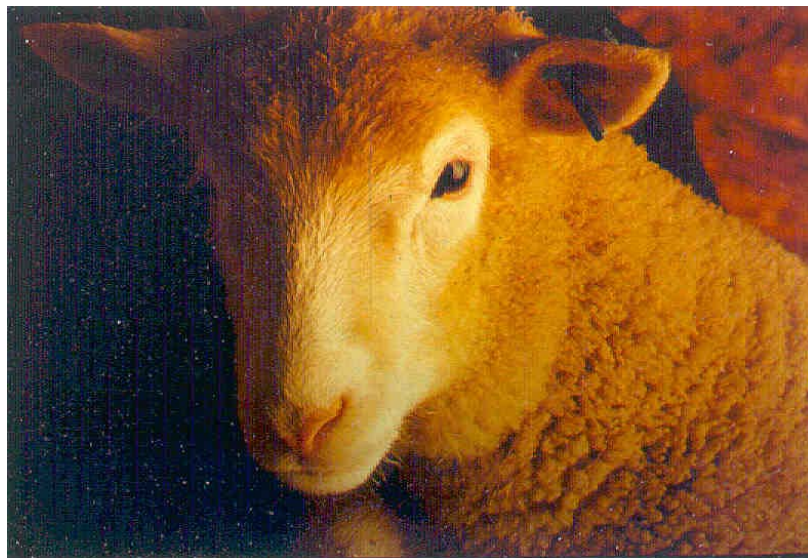


Fig. 8 Dolly: ovelha clonada por transferência nuclear somática

Fonte: Embrapa/Cenargen (2000).

A maior parte das células somáticas pode ser cultivada *in vitro* com várias passagens e resultar em proles vivas após a transferência nuclear. Bezerros foram produzidos utilizando-se fibroblastos de animais adultos (Kubota *et al.*, 2000). Um período em cultura já permite o inserto de um novo gene dentro do núcleo de células somáticas por transfecção e a seleção de linhas celulares modificadas. A

recombinação homóloga irá permitir que um gene de interesse seja inserido em um local específico do cromossomo do genoma bovino com o objetivo de facilitar uma alta expressão, como na glândula mamária, por exemplo, e produzir proteínas terapêuticas e nutritivas diretamente no leite. A utilização destas células somáticas diferenciadas como fonte doadora de núcleo para clonagem irá permitir a produção de uma primeira geração de proles idênticas, que seriam todos transgênicos sem haver mosaicismo (Heyman, *et al.*, 2000)

Se utilizada em escala muito larga, a clonagem somática poderia levar um risco em potencial de diminuição da diversidade genética. Isto poderia acontecer se milhares de cópias do mesmo animal fossem difundidas dentro da população, o que não é o caso. Ao contrário, a clonagem somática pode ser uma ferramenta valiosa para manutenção e desenvolvimento de espécies em perigo de extinção. Com estoque do sêmen de diferentes machos, um número limitado de fêmeas pode ser multiplicado pela clonagem e então poderiam posteriormente ser inseminadas com o sêmen mantido em estoque com intuito de recriar diferentes famílias e restabelecer um mínimo de diversidade genética. Recentemente na Nova Zelândia, a clonagem somática foi utilizada para preservar a última vaca sobrevivente de uma raça bovina e pelo menos 4 bezerras foram geradas desta única fêmea viva (Wells *et al.*, 1999). Esta aplicação da clonagem deve ser considerada desde agora, uma vez que já é possível o estoque de material genético de animais em risco de extinção. O estoque poderá ser feito após uma pequena biopsia de pele do animal vivo. Em seguida, a multiplica-se as células *in vitro* e por fim, congela-se estas células em nitrogênio líquido para posterior utilização, quando a eficiência da transferência nuclear tiver aumentado (Heyman, *et al.*, 2000).

Além das dificuldades biológicas e técnicas a serem resolvidas visando uma melhor eficiência, considerações éticas devem ser observadas. Com relação à aceitação desta nova biotecnologia pelo público, tal situação parece ser muito diferente dentre países de todo mundo. Pesquisas e aplicações devem considerar este aspecto com relação à máxima segurança e bem-estar animal. (Heyman, *et al.*, 2000)

12.7. Isolamento de Folículos Pré-Antrais (FOPA)

Uma das últimas “arrancadas” da reprodução assistida, a metodologia de

obtenção de FOPA em bovinos, foi desenvolvida por Figueiredo *et al.*, (1995), nos laboratórios da Universidade de Liège, na Bélgica. Essa tecnologia consiste no isolamento, caracterização e cultivo de folículos pré-antrais de 30 a 70 μ m.

É bem conhecido que os ovários dos mamíferos contém milhares de folículos pré-antrais. Entretanto, a grande maioria desses folículos se tornam atresícos durante a fase de crescimento e desenvolvimento. Conseqüentemente poucos ovócitos viáveis são produzidos durante toda a vida reprodutiva de uma fêmea. O sonho de várias equipes de pesquisadores no mundo inteiro é de prevenir essa “morte fatal” desses folículos ovarianos e usá-los com propósito reprodutivo (Telfer, 1996).

No caso da espécie bovina, a “reciclagem *in vitro*” de ovócitos oriundos desta numerosa população de folículos pré-antrais, estimado em 250.000 em média num único ovário de vaca, poderão ser recuperados e utilizados na multiplicação de animais de alto valor genético. Esta técnica servirá também para recuperar animais em vias de extinção (Bem *et al.*, 1994).

Os FOPAs são classificados em três categorias: primordiais que são os menores, ao redor de 30 μ m de tamanho; primários com 40 a 60 μ m; secundários de 60 a 200 μ m. Do ponto de vista citológico os primordiais são células planas, os primários compostos por células cúbicas e os secundários por várias camadas de células cúbicas. A população de folículos primários é dominante, ao redor de 80% (Bem *et al.*, 1994).

O modelo descrito por Figueiredo *et al.*, (1993), para isolamento dos FOPAs é mecânico e por esta metodologia foram separados 2.145, 512 e 298 folículos pré-antrais por ovários em média de feto, bezerra e vaca respectivamente (Rumpf *et al.*, 1998) e outras espécies poderão ser utilizadas (animais silvestres) para a conservação e preservação.

13. UMA ARCA PARA SALVAÇÃO

Os cientistas crêem que a melhor solução para o problema da extinção das espécies hoje em dia tem a ver com a preservação de seus habitats. Vale notar que a revista *New Scientist* trata desse assunto e cita o uso que os conservacionistas fazem da "metáfora da arca de Noé". A Arca de Noé foi exatamente o meio pelo qual seres

humanos e animais sobreviveram ao dilúvio ocorrido nos dias de Noé.

Deus forneceu a Noé o projeto da Arca, uma enorme caixa de madeira, feita para flutuar na superfície das águas diluvianas. Ela preservou a vida de Noé, de sua esposa, de seus três filhos e das respectivas esposas, junto com representantes de diferentes espécies de animais, tanto selvagens quanto domésticos. De fato, "toda sorte de carne em que a força da vida estava ativa" (Gênesis 7:15) A multiplicidade de formas de vida que existe hoje, conforme a metáfora, diz que aquela Arca serviu muito bem ao seu objetivo.

14. PROJETO ARCA DE NOÉ

14.1. BBGA – Banco Brasileiro de Germoplasma Animal

Segundo Bem *et al.*, (1996), os recursos genéticos animais correm o risco de desaparecerem em razão de inúmeros fatores. Para garantir a sobrevivência de inúmeras espécies foi criado em Brasília o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal, o BBGA, também conhecido com “Projeto Arca de Noé”. O projeto é sitiado na área física denominada “FAZENDA SUCUPIRA” com 912 hectares, destinada pelo Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária (MAARA). Na mesma fazenda, numa área de 300 hectares anexa ao BBGA funciona os laboratórios de pesquisa da EMBRAPA/CENARGEN (Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia), onde se desenvolvem pesquisas na área de biotecnologia da reprodução animal, que serve de suporte para o BBGA.



Fig. 9 Bovinos da raça Crioulo Lageano, espécie bovina ameaçada de extinção.

Fonte: Embrapa/Cenargen (1997).

O BBGA é um projeto que tem a finalidade de agrupar os animais domésticos autóctones (nativos) que estão em vias de extinção para pesquisas, conservação e multiplicação. A figura 9 mostra espécimes da raça Crioulo Lageano. Esta espécie está preservada em bancos de sêmen do BBGA. Com eles, recupera-se também parte da história do Brasil, desde a época dos portugueses e espanhóis que por aqui passaram. Os pesquisadores e técnicos do BBGA percorrem o Brasil inteiro, fotografando, filmando e interrogando pessoas e criadores, para se interarem da real situação dos animais (Bem *et al.*, 1997).

O BBGA, além da raça e espécies ameaçadas, tem como objetivo a identificação de recursos genéticos, o conhecimento de suas características fenotípicas e de produção, a caracterização genética e avaliação do material coletado, assim como a valorização local dos recursos genéticos locais (Bem *et al.*, 1997).

Uma das questões que o BBGA vem enfrentando é o da determinação racial ou mesmo confirmação da raça das amostras de animais domesticados que chegam ao Banco. Muitas vezes as informações sobre os animais coletados refere-se a um tipo racial quando na realidade eles pertencem a outro. Observam-se, por exemplo, casos de animais que são classificados em uma determinada raça de acordo com características como cor de pelagem, mas que na verdade pertencem à outra raça. Outra questão é sobre o conhecimento da variabilidade genética dos indivíduos que são conservados e/ou preservados. O estudo das características genéticas dos indivíduos, grupos ou população de animais em perigo de extinção é indispensável para que se possa preservá-los racionalmente (Bem *et al.*, 1997).

Diante do estado atual em diversidade de recursos genéticos animais, e a velocidade com que estão sendo dizimados os últimos efetivos, somente técnicas modernas de reprodução animal poderão viabilizar a recuperação deste material único e secular (Bem *et al.*, 1997).

15. CONCLUSÃO

Como se tem observado, temos herdado uma ampla variedade de diversidade genética de populações de animais domésticos e selvagens de nossos ancestrais. Entretanto, devido às altas fases de extinção, nossos descendentes, herdarão uma riqueza genética e diversidade de seleção de animais domésticos de produção muito menor, e então, é necessário que se tome ações para conservá-los.

Virtualmente todos os biólogos de conservação concordam que a preservação do habitat é o melhor caminho para conservar a biodiversidade. O povoamento animal de grandes áreas de terras livres da interferência humana pode proteger muitas espécies, mas esta abordagem tem sido caracterizada como “estranha”, dada à realidade mundial atual e do futuro (Soulé, 1992).

Desta forma, uma estratégia que surge é a formação de bancos de recursos genéticos, que são repositores de germoplasma (gametas), embriões, produtos sanguíneos, tecidos e DNA para programas de conservação definidos, os quais são ligados diretamente com as biotecnologias para a execução do objetivo final, que é a reprodução animal. (Wildt, 1997)

Como parte integrante deste processo de conservação *ex-situ*, a utilização do germoplasma masculino e feminino em criobancos, bem como o uso deste material na reprodução assistida, tem assumido papel fundamental na multiplicação e preservação animal.

A situação ideal era não termos a preocupação com a extinção dos animais, bem como com a diminuição dos genes daqueles organismos de interesse humano. No entanto, nossa realidade é outra. Desta forma, as instituições ligadas à conservação, bem como biotecnologias devem atuar de forma itinerante para reverter esta situação agressiva para todos os indivíduos do planeta.

16. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERIO, R., MOTLIK, J., KALOUS, J. et al. Activation of bovine oocytes by combination of Ca^{+2} release and inhibition of CDC2 kinase activity. *Theriogenology*, v.51, n.1, p.352, 1999.
- AMANN, R.P. Sperm production rates. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Van Demark, N.L. (Eds.), *The Testis Vol. 1* Academic Press, New York, p.433-482, 1970.
- Básico de Biologia v. 3. São Paulo: Editora Moderna. 1993. 366p.
- BEM, A. R. de. 1994A Biotecnologia da Reprodução. Atualidades e perspectivas na espécie caprina. *I Semana da Caprinocultura e da Ovinocultura Tropical Brasileira. CNPC Sobral*
- BEM, A. R. de. 1996. A fecundação in vitro na espécie bovina no Brasil – Abordagem histórica. *Arquivo Faculdade de Veterinária do Rio Grande do Sul*. Vol. 24: 135-137.
- BEM, A. R. de; FREITAS, V. C.; SOUSA, R. V.; RUMPF, R.; EGITO, A. A. ; RUMPF, L. 1992.Criopreservação de ovócitos imaturos de bovinos utilizando como crioprotetor o propanediol. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões*: p. 94
- BOURNE, H., RICHINGS, N., LIU, D.Y. et al. Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods relationship to fertilization results. *Reprod.Ferti.Dev.*, v.7, n.2, p.177-183, 1995.
- CATT, J.W. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology. *Anim. Reprod. Sci.* v. 42, n. , p. 239-250, 1996.
- CATT, J.W., RHODES, S.L. Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod. Fertil. Dev.* v.7, n.2, p.161-167, 1995.
- CHEN, S.H., SEIDEL, G.E. Bovine oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, v.47, n.1, p.248, 1997.
- DAUZIER, L., THIBAUT, C.; WINTERBERGER, S. (1954). *La fecondation in vitro de l'oeuf de la lapine*. C. R. Acad. Sci., Paris 238, 844-845.

- DUBEY, A.K., PENZIAS, A.S., REINDOLLAR, R.H. et al. Technical and physiological aspects associated with the lower fertilization following intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) in human. *Theriogenology*, v.49, n.1, p.33-41, 1998.
- EDWARDS, R.G. Cell cycle factors in the human oocyte and intracytoplasmic injection of spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* v.7, n.2, p.143-153, 1995.
- FIGUEIREDO, J. R. Isolement, caractérisation et culture de follicules préantraux chez les bovins – Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Vétérinaires, Université de Liège – Belgique, Faculté de Médecine Vétérinaire, Chaire d'obstétrique et des troubles de la reproduction, 1995.
- FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOP, S. C. J.; VAN DEN HURK, R.; NUSGENS, B.; BEVERS M. M; ECTORS, F. J.; BECKERS J. F. 1996. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. *Theriogenology*, v. 41: 1333-1346
- FLAHERTY, S., PAYNE, D., SWANN, N.J. et al. Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod.Fertil.Dev.*, v.7, n.2, p.197-210, 1995.
- FULTON, R.M., KESKINTEPE, L., DURRANT, B.S. et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for treatment of canine infertility. *Theriogenology*, v.49, n.1, 1998.
- GALLI, C., CROTTI, G., NOTARI, C. et al. High rate of activation and fertilisation following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in cattle. *Theriogenology*, v.51, n.1, p. 355, 1999.
- GALLI, C., DUCHI R., LAZZARI G. (1999). Mammalian leucocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning*, 1 (3): 161-170.
- GOMÉZ, M.C., CATT, J.W., EVANS, G. et al. Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod. Fertil. Dev.* v.10, n. , p.197-205, 1998.
- GOTO, K., KINOSHITA, A., NAKANISHI, Y. et al. Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of in vivo or in vitro derived spermatids into bovine oocytes. *Theriogenology*, v.45, n.1, p.301, 1996.

- GOTO, K., KINOSHITA, A., TAKUMA, Y. et al. Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet.Rec.*, v.127, n. , p.517-520, 1990.
- GRUPEN, C.G., DU, Z.T., VERMA, P.J. et al. Parthenogenetic development of porcine oocytes activated with multiple sets of electrical pulses. *Theriogenology*, v.51, n.1, p.356, 1999.
- HAFEZ, E. S, E. *Reprodução Animal*. 6ª edição. São Paulo: Editora Manole. 1995
- HAMANO, K., LI, X., QIAN, X. et al. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol.Reprod.*, v.60, n.5, p.1194-1197, 1999.
- HEYMAN, Y. Advance in the techniques of freezing domestic mammal embryos. Seminaire sur la Congelation des Embryons et des Ovocytes. In: Workshop on Embryos and Oocytes Freezing, Les Pensieres Annecy, Reports. P 151-163, 2000.
- HORIUCHI, T., EMUTA, C., YAMAUCHI, Y et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of bulls spermatozoa immobilized by tail scoring. *Theriogenology*, v.51, n.1, p.357, 1999.
- HOSOI, Y., KUSAKA, N., SAEKI, K. et al. Fertilization and development of rabbit oocytes injected with isolated sperm head after activation. *Theriogenology*, v.51, n.1, p.358, 1999.
- HOSOI, Y., TORII, R., MASUDA, Y. Establishment of routine IVF-ICSI-ET methodology in the japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Theriogenology*, v.49, n.1, 1998.
- KENSKINTEPE, L., MORTON, P.C., SMITH, S.E. et al. Caprine blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Theriogenology*, v.47, n.1, p.249, 1997.
- KIM, N.-H, JUN, S.H., DO, J.T. et al. Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse or human spermatozoon into porcine oocytes. *Theriogenology*, v.51, n.1, p.360, 1999.
- KRETZER, D.M. The potential of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to transmit genetic defects causing male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.* v.7, n.2, p.137-42, 1995.

- KUBOTA C., YAMAKUCHI H, TODORAKI J. *et al.*, (2000) Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long term culture. *PNAS*. vol. 97.
- KURZ, S.G., HEALY, M.R., LOSKUTOFF, N.M. *et al.* In vitro maturation and intracytoplasmic sperm injection of Western Lowland Gorilla oocytes. *Theriogenology*, v.51, n.1, p.361, 1999.
- LI, X., IWASAKI, S., NAKAHARA, T. Investigation of various conditions in microfertilization of bovine and subsequent changes in nuclei and development to embryos. *J.Reprod.Dev.*, v.39, n.6, p.55, 1993.
- MARTHO, J. M. A. & MARTHO, G. R. *Genética, Evolução e Ecologia: Curso*
- MARTINS, C.F.; FELICIANO S. *et al.*, 2000. Isolamento, identificação e armazenamento de células espermato gênicas bovinas. *Artigos da Faculdade de Veterinária UFRGS* p.285.
- MEINTJES, M., GRAFF, K.J., PACCAMONTI, D. *et al.* In vitro development and embryo transfer of sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *Theriogenology*, v.45, n.1, p.304, 1996.
- Ministério do Meio Ambiente
- OGURA, A. and YANAGIMACHI, R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol. Reprod.*, v. 48, p. 219-225, 1993.
- OGURA, A., MATSUDA, J., YANAGIMACHI, R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 91, p.7460-2, 1994.
- OGURA, A., YANAGIMACHI, R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol. Reprod.*, v.48, p. 219-25, 1993.
- OGURA, A., YANAGIMACHI, R. Spermatids as male gametes. *Reprod.Fertil.Dev.*, v.7, n.2, p.155-159, 1995.
- ONUMA, H., HAHN, J.; FOOTE, R. H. (1970). *Factors affecting superovulated ova in prepuberal cattle*. *Journal Reprod. Fertil.* 21, 119.
- PALERMO, G.D., COHEN, J., ALIKANI, M. Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod.Fertil.Dev.*, v.7, n.2, p.211-218, 1995.

- PAVAN, C., BARROS, M. B. de, et al. *A experiência Brasileira em Biotecnologia*. Biotecnologia e Desenvolvimento Nacional. São Paulo: Secretaria da indústria, comércio e tecnologia. 1986. 328p.
- PAYNE, D. Intracytoplasmic sperm injection: instrumentation and injection technique. *Reprod. Fertil. Dev.* v. 7, n.2, p.185-196, 1995.
- RHO, G., WU, B., SHELDON, K., LEIBO, S.P. et al. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Reprod. Dev.* v.50, n. 485-492, 1998.
- RICHARDSON, R., PARKS, J. E. Effects of chilling on the meiotic spindle and chromosomes of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.37, n.1, p.284, 1992.
- RUBINSKY, B., ARAV, A., DEVRIES, A. L. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. *Cryo-Letters*, v.12, p.93-106, 1991.
- SCHELLANDER, K. et al. In vitro fertilization of frozen-thawed cattle oocytes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION. 11, 1988, Dublin. *Proceedings...* Dublin, Ireland: [s.n.], 1988. v.3, p.349.
- SCHELLANDER, K., PELI, J., SCHOMOLL, F., BREM, G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmaturred bovine oocytes. *Theriogenology*, v.42, n.6, p.909-915, 1994.
- SCHIEWE, M.C., RINGLER, G.E., STEIN, A.L. et al. High fertilization, cleavage and pregnancy rates using a simplified intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure in human infertility treatment. *Theriogenology*, v.45, n.1, p. 303, 1996
- SHITH, C. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, 1990 v. 29, n. 1, p. 203-212.
- SMITH, C. 1988. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, v. 29: 203-212.
- SOARES, J. L. *Dicionário de Biologia*. São Paulo: Scipione, 1993. 534 p.
- SOFIKITIS, N. MIYAGAWA, I., AGAPTOS, E. Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* v.11, p.335-341, 1994.

- SOLTI, L.; GRICHTON, E.G.; LOSKUTOFF, N.M.; CSEH, S. 2000. Economical and ecological importance of indigenous livestock and the application of assisted reproduction to their preservation. *Theriogenology*, 53:149-162.
- SQUIRES, E.L., McCUE, P.M., VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, n.1, 1999.
- SQUIRES, E.L., WILSON, J.M., KATO, H. et al. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, v.45, n.1, p.306, 1996.
- SREENAN, J. M. (1978). Non-surgical embryo transfer in the cow. *Theriogenology* vol. 9, 69.
- STEFFEN, D. Genetic causes of bull infertility. *Vet.Clin.N.Am.*, v.13, n.2, p.243-253, 1997.
- TELFER, E. E. 1996. The development of methods form isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, v. 29: 101-110.
- THIBAULT, C. AND DAUZIER, L. (1960). *La fecondation in vitro de l'oeuf de la lapine*. C. R. Acad. Sci., Paris 250, 1358-1359.
- THIBAULT, C. AND DAUZIER, L. (1961). Analyse des conditions de la fecondation in vitro de de l'oeuf de la lapine. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 1, 227-294.
- THIBIER M. 1990. New biotechnologies in cattle production. *7th Congress of the F. A. V. A. Pattaya (Thailande)* p. 513-524.
- TOCHARUS, C., KITTYANANT, Y., PAVASUTHIPASIT, K. Fertilization and subsequent development of bovine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using different injection pipettes. *Theriogenology*, v.45, n.1, p.302, 1996.
- TROUNSON, A. O., ROWSON, L. E. A.; WILLADSEN, S. M. (1978a). *Non-surgical transfer of bovine embryo*. *Vet. Rec.* 102, 74.
- UEHARA, T., YANAGIMACHI, R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.*, v. 15, p. 457-70, 1976.
- URL <http://www.maara.gov.br>
- URL <http://www.veja.com.br>

- VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P. J., JACOBSEN, H., GREVE, T., CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, v. 51, n.1, p.53-58, 1998.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology*, v.47, p. 501-509, 1997.
- VAN CAMP, S.D. Common causes of infertility in the bull. *Vet.Clin.N.Am.*, v.13, n.2, p.203-231, 1997.
- Veja Ed. Abril S.A. Ano 34. Junho 2001.
- WAKAYAMA T., PERRY A. C. F., ZUCCOTTI M., JOHNSON K. R., YANAGIMACHI R. (1998). Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cells nuclei. *Nature*, 394:369-374.
- WEELS D., MISICA P., FORYSTH J. *et al.*, (1999). The use of adult somatic cloning to preserve the last surviving cow of the Enderby island cattle breed. *Theriogenology*, 51:217.
- WHITTINGHAM, D. G. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C . *J. Reprod. Fertil.*, v.49, n.1, p. 89-94, 1977.
- WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P., MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, v.178, p. 411-414, 1972.
- WILMUT I., SCNIEKE A., McWHIR J. *et al.*, (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810-813.
- WOOD, M. J., CARROL, J., CANDY, C. Cryopreservation of mouse oocytes by vitrification. *J. Reprod. Fertil.*, p.29, 1991. (Abstr. Ser. n.7)
- WRIGHT, JR., R. W. AND BONDIOLI, K. R. (1981). *Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals*. J. Anim. Sci. 53- 701.
- XU, K. P., GREEVE, T. A. Detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.82, n.1, p.127-134, 1988.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization, In: KNOBIL, E.; NEILL, J. *Physiology of Reproduction*, New York., Raven Press LTDA. 1988. p. 135-185.

ZI-YI, L., QI, Z., XING-LAO, W. et al. Microinjection of mouse spermatozoa into rabbit oocytes. *Theriogenology*, v.47, n.1, p.250, 1997.